

Universidad Autónoma de Madrid



Facultad de Biología

Máster en Microbiología

La Dra. Teresa Requena Rolanía del Departamento de Biotecnología y Microbiología de los Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación.

Certifica:

Que Elvira Barroso Merinero ha realizado el trabajo de investigación titulado: “Interacciones de los polifenoles del vino con la microbiota de la cavidad bucal humana” bajo su dirección en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM).

Este trabajo ha sido subvencionado por el Proyecto de Investigación AGL2009-13361-C02-02

RESUMEN

La cavidad bucal alberga un complejo ecosistema con diferentes microambientes (mejillas, paladar, lengua, superficie de los dientes, encías y saliva), está compuesto por cientos de especies de microorganismos diferentes, la mayoría de los cuales son bacterias y solo cerca del 50% de estas especies se pueden cultivar. Algunos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que muchos de los componentes naturales de los alimentos y bebidas provocan modificaciones en esta microbiota. Los polifenoles de los alimentos pueden modificar el crecimiento de microorganismos susceptibles. El vino, es una rica fuente de polifenoles y por ello el consumo moderado de esta bebida puede permitir la modulación de la microbiota oral e intestinal humana. La composición fenólica del vino tinto se caracteriza por la presencia principalmente de flavan-3-oles, flavonoides, antocianinas, ácido hidroxibenzoico, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos y alcoholes fenólicos, compuestos que potencialmente pueden producir la modulación de la microbiota humana por el consumo de vino

El objetivo de este trabajo se ha centrado en el estudio de los posibles efectos de los polifenoles del vino sobre la microbiota de la cavidad bucal a través de un estudio de intervención en humanos. A partir del DNA de las muestras de saliva obtenidas de un grupo de individuos sanos que habían estado consumiendo vino de forma moderada durante 28 días, se realizaron análisis de la población microbiana a través de la separación de los fragmentos amplificados por PCR utilizando la técnica de electroforesis en gel de de gradiente desnaturizante (DGGE), así como la cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR). Los perfiles de DGGE obtenidos y los recuentos de microbiota bacteriana total no mostraron diferencias significativas de diversidad o cantidad bacteriana asociadas al consumo de vino. Sin embargo, sí se han observado diferentes patrones de comunidades bacterianas entre los distintos individuos sujetos al estudio.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. <i>Polifenoles del vino</i>	6
1.2. <i>Microbiota bucal</i>	8
1.3. <i>Interacciones de los polifenoles del vino con la microbiota oral</i>	11
1.3.1. <i>Metabolismo de los polifenoles del vino por bacterias orales</i>	11
1.3.2. <i>Efecto de los polifenoles del vino y sus metabolitos en la microbiota oral</i>	12
1.4. <i>Métodos de estudio de la microbiota oral. Técnicas moleculares</i>	13
1.4.1. <i>Técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	14
1.4.2. <i>Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)</i>	14
1.4.3. <i>PCR a tiempo real o cuantitativa (RTi-PCR)</i>	15
1.4.4. <i>Secuenciación</i>	16
1.4.5. <i>Metagenómica</i>	17
2. OBJETIVO.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. <i>Diseño del estudio de intervención en humanos</i>	19
3.2. <i>Recogida de muestras</i>	20
3.3. <i>Extracción de DNA</i>	20
3.4. <i>Incubación in vitro de sedimentos bacterianos de saliva con polifenoles de uva</i>	21
3.5. <i>Análisis por PCR-DGGE</i>	21
3.5.1. <i>Amplificación de DNA y preparación de geles de gradiente desnaturalizante</i>	21
3.5.2. <i>Revelado de los geles</i>	22
3.6. <i>Recuperación de bandas y secuenciación</i>	23
3.7. <i>PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR)</i>	23
3.7.1. <i>Obtención de la curva de calibrado y evaluación de la eficiencia de los cebadores empleados</i>	23
3.7.2. <i>Reacción de RTi-PCR</i>	24
3.7.3. <i>Análisis de los datos obtenidos mediante RTi-PCR</i>	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. <i>Optimización en el tratamiento de muestras y extracción del DNA</i>	25
4.2. <i>Modulación in vitro de la microbiota bucal con extractos fenólicos</i>	27
4.3. <i>Perfiles microbianos de saliva obtenidos por DGGE. Consecuencias del consumo moderado de vino</i>	29
4.4. <i>Análisis de la curva de calibrado y eficiencia de los cebadores empleados en la RTi-PCR</i>	36
4.5. <i>Cuantificación de bacterias de la saliva por RTi-PCR</i>	36
5. CONCLUSIONES.....	38
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la importancia de la salud bucal y su impacto en la salud en general ha sido destacada por investigadores dentales, médicos y profesionales afines (Signoretto y Canepari, 2009). La cavidad oral es un complejo sistema de tejidos y órganos que se utilizan para la selección de los alimentos durante la ingesta, así como para su transformación en formas adecuadas para la digestión en el resto del tracto gastrointestinal (TGI). Una de las principales funciones de la microbiota del TGI es la transformación de carbohidratos, proteínas y compuestos no nutritivos en moléculas más absorbibles que sirven como nutrientes para las bacterias hospedadoras y transeúntes. Por otra parte, la microbiota intestinal se considera que juega un papel esencial en el sistema de defensa del huésped. En este sentido, es bien conocido que una microbiota intestinal equilibrada protege contra trastornos intestinales, enfermedades inflamatorias, cáncer, obesidad, etc. (Carroll, Threadgill, y Threadgill, 2009). Todos los cambios indeseables en la composición de esta microbiota podrían modificar su función protectora. Además de los aspectos mencionados, la dieta influye en el establecimiento de las bacterias y su grado de colonización intestinal y bucal y, por tanto, en la composición y actividad de la microbiota del ser humano. Por lo tanto, es importante determinar si el consumo de componentes específicos de los alimentos es capaz de modificar la colonización de la microbiota bucal e intestinal.

En los últimos años, ha aumentado el interés científico por las interacciones entre los polifenoles de los alimentos y la microbiota intestinal (Selma, Espín, y Tomás-Barberán, 2009). En este sentido, cada vez hay más estudios sobre los derivados del vino y la uva debido a su alto contenido en polifenoles, su diversidad estructural y sus potenciales beneficios para la salud (Forester y Waterhouse, 2009).

Las principales transformaciones de los polifenoles del vino tienen lugar en el colon, donde pueden ser transformados en metabolitos más bioactivos que sus precursores (Aura, 2008; Selma et al, 2009). Fisiológicamente, estos cambios están asociados con el metabolismo bacteriano de polifenoles, junto con la capacidad de los polifenoles del vino y sus metabolitos resultantes de inhibir o estimular selectivamente el crecimiento de las bacterias del intestino, también conocido como modulación de la microbiota intestinal. En cuanto a la microbiota oral, se ha demostrado recientemente el papel de los componentes del vino en la salud bucal (Kongstad et al., 2008), y los esfuerzos se han dirigido a la detección y caracterización de diferentes compuestos

polifenólicos beneficiosos por mostrar actividad antimicrobiana (Furiga, Lonvaud, y Badet, 2009). Sin embargo, hay muy poca información disponible en la actualidad relativa a la modulación bacteriana por parte de los polifenoles del vino en la cavidad bucal.

1.1. Los polifenoles del vino

El vino es un producto alimenticio en el que el componente principal, después del agua, es el etanol, por lo general por encima del 10%. Sin embargo, a pesar de los posibles efectos tóxicos del etanol, por lo general se acepta que el consumo moderado de vino tiene efectos beneficiosos para la salud (Pozo-Bayón et al., 2010). En los últimos años, ha habido un aumento significativo en la investigación relacionada con la actividad biológica de los compuestos del vino y, sobre todo, con su biodisponibilidad en el organismo humano. La mayoría de estos estudios han revelado que los compuestos fenólicos podrían jugar un papel clave en los efectos positivos para la salud derivados del consumo moderado de vino (Pozo-Bayón et al., 2010), particularmente en relación con las enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis y enfermedad coronaria (Dávalos y Lasunción de 2009, Renaud y De Lorgeril, 1992). En base a esta evidencia científica, se ha producido un aumento en el diseño y comercialización de ingredientes o suplementos dietéticos enriquecidos en polifenoles de la uva o subproductos de la vinificación para el consumo humano y animal (Monagas et al., 2005).

Los compuestos fenólicos en el vino se pueden clasificar en no flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos, aldehídos hidroxibenzoicos, alcoholes fenólicos y estilbenos, así como elagitaninos extraídos de las barricas de roble) y flavonoides (antocianos, flavonoles, dihidroflavonoles, flavan-3-oles y sus formas oligoméricas y poliméricas, también los llamados proantocianidinas o taninos condensados) (Fig. 1). Las antocianinas son componentes característicos de los vinos tintos, mientras que los principales compuestos fenólicos en los vinos blancos son los ácidos hidroxibenzoicos y ésteres de ácido tartárico de ácidos hidroxicinámicos (ácidos coutárico y caftárico). El contenido de polifenoles en el vino varía dependiendo de la variedad de uva y de las prácticas enológicas realizadas. En este sentido, basado en análisis de cromatografía, el contenido promedio de polifenoles es de 10,38 mg/100 ml para los vinos blancos, y 107,44 mg/100 ml para los vinos tintos (Neveu et al., 2010).

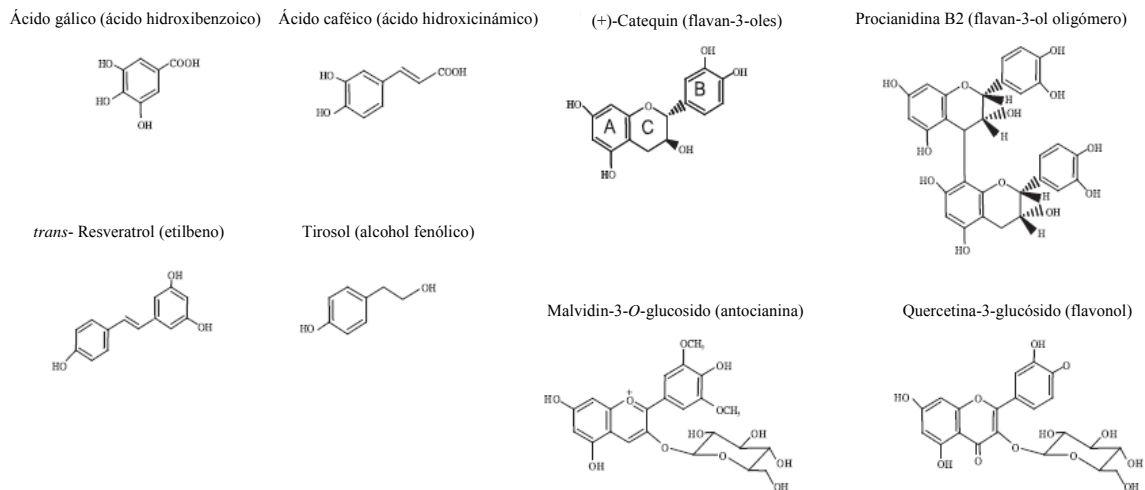


Fig. 1. Compuestos fenólicos representativos de los principales grupos presentes en el vino.

Con el fin de que el organismo haga uso de las propiedades saludables de los polifenoles del vino, éstos deben ser absorbidos para llegar a los tejidos diana y a los órganos. Sin embargo, la biodisponibilidad de los polifenoles del vino está limitada por su reconocimiento como xenobióticos por parte del organismo humano. Por otro lado, en relación a la estructura química de los compuestos fenólicos del vino, se ha demostrado que influye directamente en su biodisponibilidad, por ejemplo, limitando el sitio de la absorción intestinal ya sea en el intestino delgado o en el colon, que influye en la farmacocinética de su absorción, la extensión del metabolismo y, por último, la cantidad excretada en la orina (Donovan et al., 2006; Manach, et al., 2004).

Algunos compuestos fenólicos no glicosilados presentes en el vino, como flavan-3-oles y, en menor medida, procianidinas diméricas, se absorben directamente en el intestino delgado sin modificación química previa. En el caso de polifenoles glicosilados, como las antocianinas, flavonoides y resveratrol, su transformación podría comenzar en la boca con la hidrólisis de la unidad glucosídica por acción de enzimas β -glucosidasas de las bacterias y/o células epiteliales de la cavidad oral, como ha sido reportado para varios glucósidos de quercetina (Walle et al., 2005). La mayor hidrólisis de estos compuestos se produce en el intestino delgado por acción de β -glucosidasas intestinales, seguido por la difusión pasiva a través de los enterocitos, así como por β -glucosidasas citosólicas (CBG) en las células epiteliales (Donovan et al., 2006). Tras atravesar las vellosidades intestinales, los polifenoles sufren metabolismo hepático, pasan a la circulación sistémica y finalmente se eliminan por la bilis o en la orina. Otros

polifenoles del vino, que no son absorbidos en su forma nativa, son metabolizados por la microbiota del colon, así como con algunos metabolitos de fase II que llegan al colon por la circulación entero-hepática, antes de la absorción. Las bacterias intestinales capaces de metabolizar los polifenoles podrían jugar un papel importante en la producción de compuestos fenólicos a partir de otros polifenoles, que podrían tener mejor biodisponibilidad y mayor actividad biológica que sus compuestos de origen, y participar en la protección del cuerpo humano por acción sistémica y local.

1.2. Microbiota bucal

Ambos extremos del tracto orogastrointestinal de los seres humanos poseen una microbiota abundante dominada por bacterias anaerobias. El número de bacterias en la cavidad bucal ronda las 10^{11} bacterias/g de placa dental y 10^8 – 10^9 bacterias/ml de saliva, mientras que en las heces las cifras alcanzan las 10^{11} – 10^{12} bacterias/g. (Carroll et al, 2009; GuRNAer y Malagelada, 2003). Estudios recientes (Maukonen et al., 2008) indican que se pueden encontrar los mismos géneros bacterianos en muestras orales y colónicas. Por ejemplo, en ambas regiones se pueden detectar tanto bifidobacterias como lactobacilos, aunque su incidencia es diferente; los lactobacilos son un hallazgo común en la cavidad bucal mientras que las bifidobacterias se detectan más frecuentemente en el colon.

La cavidad bucal contiene diferentes microambientes (mejillas, paladar, lengua, superficie de los dientes, encías y saliva) cada uno con su propia microbiota. Por lo tanto, la composición de la microbiota oral varía en las distintas superficies (por ejemplo, dientes o mucosa), y en lugares sobre una superficie específica (por ejemplo, fisuras o surco gingival), lo que demuestra que las pequeñas diferencias en el hábitat pueden afectar a la capacidad de especies individuales para colonizar y dominar (Marsh y Percival, 2006). Sin embargo, se ha descrito que las especies comunes a todos los lugares de la cavidad bucal pertenecen a los géneros *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* y *Veillonella* (Aas et al., 2005). En estudios realizados tomando muestras de varios nichos intraorales de individuos sanos (superficies dentales, mejillas, paladar duro, lengua y saliva) se encontraron 3600 secuencias únicas, más de 500 OTUs (unidades taxonómicas operativas) diferentes o filotipos a nivel de especie y de 88 a 104 taxones. Los taxones predominantes pertenecían a *Firmicutes* (género *Streptococcus*, familia *Veillonellaceae*, género *Granulicatella*), *Proteobacteria* (géneros *Neisseria*, *Haemophilus*), *Actinobacteria* (géneros *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*),

Bacteroidetes (géneros *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) y *Fusobacteria* (género *Fusobacterium*) (Zaura et al., 2009). La microbiota bucal, por tanto, se compone de un gran número de organismos diversos. Muchos de ellos crecen en biofilms formando comunidades unidas a las superficies de los dientes y la lengua. Las múltiples especies que componen estas comunidades constituyen redes célula-célula de interacciones entre especies.

La saliva que fluye por la boca baña superficies limpias y células adheridas, con una gran variedad de especies en suspensión presentes en la saliva. Los primeros estudios de van der Hoeven et al. (1984, 1987) sobre la capacidad de las bacterias orales para crecer en la saliva como la única fuente de nutrientes muestran que varias especies de *Actinomyces* pudieron crecer, pero que tres especies de *Streptococcus* no crecieron a base de saliva. Se midió la actividad enzimática de una amplia variedad de bacterias, incluyendo glicosidasas, peptidasas y esterases, llegando a la conclusión de que la unión específica de las bacterias orales a las glicoproteínas salivales es un posible mecanismo para localizar nutrientes en las proximidades de la célula (de Jong y van der Hoeven, 1987). Estas glicoproteínas de alto peso molecular, conocidas como mucina, se componen de numerosas cadenas laterales de oligosacáridos unidas a proteínas por enlaces O-glucósidos y sirven como fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano. Van der Hoeven et al. (1991) estudiaron las actividades enzimáticas de varias especies bacterianas, utilizando la mucina gástrica de cerdo, como sustrato modelo de saliva humana dada su similitud estructural (Herp et al., 1979), como única fuente de hidratos de carbono para el crecimiento microbiano. Estos investigadores informaron que *Streptococcus sanguis* Ny 584 alcanzó significativamente mayor densidad celular en cultivos quimiostáticos mezclados con *Streptococcus oralis* Ny 586 que en cultivo puro, apoyando la hipótesis de que las bacterias coordinan sus actividades enzimáticas complementarias para incrementar el uso eficiente de la mucina. Estos estudios se han ampliado para incluir la influencia del ambiente anaerobio y el papel de la agregación entre especies en el establecimiento de una comunidad microbiana oral estable (Bradshaw et al., 1998). Estos investigadores demostraron que la co-agregación entre *Fusobacterium nucleatum* y otras especies anaerobias como *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella nigrescens*, facilita la supervivencia de estos anaerobios estrictos en entornos oxigenados. Wickstrom et al. (2008) exploraron la degradación proteolítica de una glicoproteína oligomérica de la mucina humana (MUC5B) como única fuente de nutrientes para las bacterias orales. La

placa dental y un consorcio de 4 especies lograron degradar MUC5B, por el contrario, no lo hicieron cada una de las especies de forma individual. Estas investigaciones demuestran que, cuando las especies bacterianas cooperan dentro de una comunidad, crecen a partir de saliva y mucina de forma más rápida y eficiente. Además, dentro de los biofilms, las bacterias residentes pueden obtener ventajas significativas tales como la protección ante las defensas del huésped y los antibióticos y, por lo tanto, las principales enfermedades asociadas con la cavidad bucal humana son resultado de la actividad de las comunidades microbianas, no de microorganismos individuales. (Jenkinson y Lamont, 2005).

La adhesión a la cavidad oral es el primer paso para el desarrollo de las comunidades de muchas especies de *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* y *Neisseria*. La retención de *Porphyromonas* spp. se ve favorecida por su asociación con estreptococos. Las condiciones anaerobias promueven la incorporación de *Fusobacterium* spp., género que a su vez facilita el crecimiento de *Treponema* spp., que forma parte del llamado “grupo rojo” de patógenos periodontales identificado por Socransky et al. (2004). La adhesión inicial implica invariablemente la unión de las bacterias a los componentes de la saliva, que son adsorbidos a las superficies de la cavidad bucal, que sirve como un sustrato para la adhesión de los llamados primeros colonizadores (Bodet et al., 2008). Las bacterias de la saliva unidas a la película proliferan en la superficie, y dan lugar a micro-colonias, de las cuales los estreptococos (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. criceti* y *S. rattus*) se asocian con frecuencia a caries dental. Posteriormente, nuevas especies de bacterias son capaces de adherirse a las células de las bacterias presentes en el biofilm y proliferar. La capacidad de adhesión de las bacterias colonizadoras tempranas da lugar a una ventaja selectiva en el inicio de la formación de biofilms. Por lo tanto, la ingesta de bacterias no invasivas colonizadoras puede retrasar o prevenir la colonización por bacterias cariogénicas o patógenos periodontales (Kaufman y Lamster, 2000).

La proliferación bacteriana consecuencia de una dieta rica en azúcares, como la sacarosa, y de la pobre higiene bucal, puede llegar a producir patologías como caries, gingivitis y periodontitis (Lamont et al., 2006, Marsh y Martin, 1999, Wilson, 2008). Existen muchas estrategias para reducir la acumulación de placa, desde la restricción del consumo de azúcar, hasta la vacunación contra bacterias odontopatógenas específicas (*S. mutans*) o el uso de agentes antimicrobianos en enjuagues bucales o pastas dentífricas. Otra característica importante de la cavidad oral es que puede ser una fuente

importante de bacterias causantes de infecciones respiratorias, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y que pueden causar infecciones en los pulmones (Paju y Scannapieco, 2007).

Al estudiar la microbiota oral, un aspecto importante a considerar es que las bacterias en los biofilms son mucho menos sensibles a los antibióticos y los tratamientos antimicrobianos que las células planctónicas. Este aumento de la resistencia a los antimicrobianos es una de las razones principales para el estudio de las bacterias en biofilms modelo, para poder predecir con fiabilidad la eficacia *in vivo* de los antimicrobianos. Los modelos experimentales para estudios a corto plazo implican la necesidad de una superficie sólida para la adherencia de las bacterias (Guggenheim et al., 2004). Estudios realizados con un sistema de biofilm *in vitro* en dientes experimentales ha llevado a los mismos resultados que con su replica *in vivo*, proporcionando así una herramienta fiable e interesante para reducir la experimentación animal (Thurnheer et al., 2008).

1.2. Interacciones de los polifenoles del vino con la microbiota oral

1.3.1. Metabolismo de los polifenoles del vino por bacterias orales

A pesar de que la boca juega un papel importante a favor de la liberación de los compuestos fenólicos de la matriz del alimento, hace poco que ha recibido especial atención la interacción entre los polifenoles del vino y la microbiota bucal. Las rutas involucradas en el metabolismo de compuestos fenólicos por la microbiota bucal aún no se conocen. Por medio de estudios *in vitro* con cultivos celulares, se ha demostrado que los flavonoles-3-O-glucósidos pueden ser hidrolizados por bacterias de la boca y/o por las células epiteliales que dan lugar a las agliconas correspondientes (Walle et al., 2005). La hidrólisis de estos compuestos parece estar relacionada con la actividad β -glucosidasa de algunas cepas de bacterias ácido lácticas presentes en la cavidad oral y es similar a la descrita en la saliva humana. Aunque se ha descrito que una cepa de *Streptococcus milleri* aislada de la cavidad oral, es capaz de deglicosilar rutina en quercetina (Parisis y Pritchard, 1983), prácticamente no hay estudios centrados en los grupos de microorganismos que poseen esta actividad metabólica u otras actividades que participan en la degradación de compuestos fenólicos de diferentes estructuras químicas. Además, también es importante tener en cuenta el efecto de la saliva por sí misma, ya que esta puede modificar la estructura de los compuestos fenólicos del vino (Hirota et al, 2001; Yang et al., 1999).

1.3.2. Efecto de los polifenoles del vino y sus metabolitos en la microbiota oral

El efecto de los polifenoles de la dieta sobre la microbiota oral es una temática de investigación incipiente, pero que está creciendo muy rápidamente. Estudios llevados a cabo utilizando diferentes polifenoles del té, sobre todo flavonoides, y extractos de té e infusiones, han demostrado un poderoso efecto protector de esta bebida contra la descomposición dental en animales y humanos (Friedman, 2007). Se ha demostrado recientemente que las proantocianidinas de tipo A y flavonoles del arándano pueden interrumpir el desarrollo del biofilm de *S. mutans* y de su acidogenicidad (Duarte et al., 2006). Trabajos publicados recientemente demuestran con estudios *in vitro* e *in vivo*, en animales y en humanos, los efectos de los polifenoles del té y del arándano sobre los patógenos orales (principalmente *S. mutans*) y las implicaciones de estos productos en la prevención de las enfermedades orales/dentales (Wu y Wei, 2009; Bodet et al, 2008). A pesar de que los mecanismos de acción no están completamente entendidos, parece ser que los polifenoles del té y el arándano inhiben el crecimiento y la adhesión de los microorganismos asociados a la caries dental en la superficie del diente. Son todavía escasos los datos sobre la actividad anticariogénica de los polifenoles del vino y la uva.

La actividad antimicrobiana frente a estreptococos orales ha sido demostrada tanto en vino tinto como en blanco sin grandes diferencias entre ellos (Daglia et al., 2007). Los compuestos responsables de dichas actividades son los ácidos succínico, málico, láctico, tartárico, cítrico y acético. Además de estos componentes del vino, se tiene conocimiento recientemente de que los extractos fenólicos del vino y la uva (Furiga et al. 2009), así como extractos fenólicos de la pulpa de diferentes variedades de uva tinta (Thimote et al., 2007), también pueden tener efectos antimicrobianos frente a diferentes especies de *Streptococcus* y otras bacterias que participan en infecciones odontológicas. Aunque el contenido de antocianinas y flavonoides varía en gran medida en función de la variedad de uva y el tipo de extracto, se ha demostrado que todos los extractos fenólicos de la uva inducían alrededor del 80% de inhibición de la actividad enzimática de estreptococos involucrada en la caries (Thimothe et al., 2007). Además, la producción de ácido de *S. mutans* fue inhibida por los extractos de uva sin afectar la viabilidad bacteriana. El efecto de los enjuagues bucales con bebidas con polifenoles (incluyendo varios tipos de té y vino) en la adhesión inicial de bacterias en la cavidad oral también ha sido investigado. El porcentaje más bajo de adherencia bacteriana se encontró con los enjuagues con vino tinto, pudiendo contribuir a la prevención de la formación de biofilms (Hanning et al., 2009). En un estudio reciente, también se ha

demostrado que extractos de uva pasa, que contienen 5-hidroxi-2-furfural entre otros componentes, también pueden inhibir el crecimiento de patógenos orales (Wu, 2009). Se ha descrito que extractos de semillas de uva que contienen proantocianidinas, influían positivamente en el proceso de desmineralización y/o remineralización *in vitro* de lesiones por caries de la raíz dental (Wu, 2009). Estudios *in vivo* también han revelado que las pasas pueden impedir el descenso del pH de la placa dental por debajo de pH 6 durante un período de 30 min en niños de entre 7 y 11 años, lo que indica el potencial de la uva y sus productos derivados en la salud oral (Wu, 2009). Finalmente, un estudio realizado por Signoretto et al. 2006 mostró que las personas que consumen regularmente alimentos y bebidas que contienen polifenoles, poseen niveles inferiores de bacterias cultivables en su saliva y placa dental. El estudio se basó en el análisis por electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) de muestras de placa dental, observándose que los individuos que consumen de manera regular café y vino tenían menos bandas que los consumidores de agua. Este resultado sugiere que la placa dental de bebedores de café y vino es menos rica en especies (Signoretto et al. 2010). Estos estudios abren la posibilidad de emplear estos polifenoles como agentes naturales para prevenir la formación de la placa dental, y enfatizan la necesidad de estudios más amplios que consideren los distintos grupos de polifenoles presentes en el vino y taxones bacterianos que forman parte del ecosistema bucal.

1.4. Métodos de estudio de la microbiota oral. Técnicas moleculares

Como se ha descrito en apartados anteriores, la cavidad bucal es un hábitat muy rico y diverso del cual solo podemos cultivar cerca del 50% de los microorganismos presentes (Wilson, 2008). Aunque es reconocido como un complejo sistema microbiano, la mayoría de los estudios experimentales de investigación de la microbiota bucal y la placa dental se han centrado en una única especie o un consorcio seleccionado y no desde una perspectiva de ecología microbiana. Los métodos de identificación de bacterias basados en análisis genéticos son una herramienta muy útil en el estudio de la microbiota oral humana, ya que estas técnicas tienen la ventaja de analizar la composición microbiana global sin necesidad de aislamientos previos, permitiendo la detección de bacterias no cultivables. Las ventajas de las técnicas moleculares frente a los tradicionales medios de cultivo son la rapidez, sensibilidad y reproducibilidad. Estas técnicas moleculares están basadas en el análisis de secuencias conservadas de DNA o RNA. La mayoría de las técnicas emplean el gen 16S rRNA ya

que es un gen altamente conservado y permite la comparación filogenética entre bacterias. La elección de una técnica u otra depende del objetivo que se pretenda. De este modo, para identificar la microbiota a nivel de especie podrían emplearse técnicas de clonaje o secuenciación; para estudiar la diversidad de una población microbiana se suelen emplear las llamadas técnicas de huella genética, tales como DGGE y TGGE; y para cuantificar especies o grupos taxonómicos encontramos la hibridación dot-blot, FISH y PCR a tiempo real o cuantitativa (Mayo et al., 2008).

1.4.1. Técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se basa en la amplificación de un gen o una parte de un gen a partir de una pequeña cantidad de DNA o RNA (previo paso a cDNA) mediante la repetición de ciclos alternos de temperaturas para la desnaturalización, unión de cebadores y extensión de la cadena mediante una enzima Taq polimerasa. El proceso permite la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos flanqueada por secuencias homólogas a cebadores sintéticos previamente diseñados. La Nested PCR es una variante de la PCR convencional que aumenta la especificidad de los productos de la reacción. Comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de DNA más extensa, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica. Es posible combinar la PCR con otras técnicas, las cuales se comentarán a continuación.

1.4.2. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

La técnica DGGE fue desarrollada por primera vez en 1983 por Fischer y Lerman para la identificación de mutaciones en genes humanos. Más adelante se ha venido empleando para el análisis de poblaciones microbianas basadas en secuencias específicas del gen 16S rRNA. El fundamento de la técnica se basa en la separación electroforética de moléculas de DNA que tienen la misma longitud pero diferente secuencia nucleotídica (Lerman et al., 1984).

La separación en los geles de poliacrilamida se produce por un agente desnaturalizante (urea y formamida en DGGE y temperatura en TGGE) que desdobra las hebras de DNA. Para prevenir la completa disociación de las hebras se añade un

anclaje de 30 a 50 bases nucleotídicas de guaninas (G) y citosinas (C) unidas al extremo 5' de uno de los cebadores. Ya que la migración de la molécula depende de su desnaturalización y a su vez de la secuencia nucleotídica, la técnica DGGE/TGGE es capaz de distinguir especies que difieran en tan sólo una base nucleotídica. Para visualizar las bandas en el perfil DGGE se puede llevar a cabo una tinción con bromuro de etidio, Sybr Green o plata. La tinción con plata es el método de detección más sensible aunque tiene el inconveniente de teñir moléculas de DNA tanto de una como de doble cadena que existan en la muestra (Muyzer y Smalla, 1998). La intensidad de las bandas obtenidas aporta información semi-cuantitativa de la abundancia relativa de esa población en concreto. Las bandas en un gel de DGGE pueden identificarse directamente por comparación de la migración y perfil de las bandas contra un marcador de DGGE de amplicones obtenidos con cepas bacterianas conocidas, o mediante purificación de la banda de DNA obtenida, reamplificación, secuenciación y comparación con las bases de datos existentes (Genbank).

La técnica PCR-DGGE ha sido utilizada para estudiar la diversidad y evolución de poblaciones microbianas en muestras de la cavidad bucal (Maukonen et al., 2008), donde se observó que el grupo *Clostridium coccooides*–*Eubacterium rectale* y las bifidobacterias son estables en el tiempo y sus perfiles difieren entre la saliva y las heces humanas. Sin embargo, los perfiles de *Lactobacillus* son inestables en el tiempo, pero similares entre saliva y heces dentro de un mismo individuo. También se ha utilizado para detectar cambios en la comunidad microbiana asociados con el consumo de café y vino (Signoretto et al., 2010), como herramienta de diagnóstico periodontal (Zijnge et al., 2006) o para el desarrollo de nuevos medios de cultivo para comunidades microbianas orales (Tian et al., 2010). Gracias al perfil microbiano obtenido con esta técnica, estos autores consiguieron demostrar que el medio que desarrollaron para el cultivo de la microbiota de la saliva, utilizando proteosa peptona, peptona tripticasa y extracto de levadura como componentes básicos, completado con mucina, hemina, vitamina K, urea y arginina (SHI), es capaz de soportar el crecimiento de una amplia variedad de especies bacterianas de la cavidad bucal.

1.4.3. PCR a tiempo real o cuantitativa (RTi-PCR)

En la RTi-PCR, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior. La cantidad de DNA sintetizado en cada ciclo se mide mediante detección por fluorescencia, ya que la

emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad del DNA diana presente en la reacción. Los agentes fluoróforos pueden ser de dos tipos principalmente: agentes inespecíficos como SYBR Green y sondas específicas marcadas con fluorocromos como las balizas moleculares (“molecular beacons”) y las sondas de hibridación (sistema TaqMan). Los agentes inespecíficos son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. El más empleado en RTi-PCR es el SYBR Green. La optimización de las condiciones de la reacción es fácil y además es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes inespecíficos, como su nombre indica, es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados. Para mejorar la especificidad del proceso, se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, la mayoría de los equipos para RTi-PCR tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del DNA de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Entre las aplicaciones de la RTi-PCR sobre microbiota oral se encuentran estudios de diagnóstico de enfermedades periodontales (Maeda et al., 2003), relaciones entre microbiota oral y periodontitis crónica (Braga et al., 2010) o de modulación de las poblaciones bacterianas de la placa dental por la administración oral de probióticos (Mayanagi et al., 2009).

1.4.4. Secuenciación

El método más empleado para la identificación taxonómica es la secuenciación del gen 16S rRNA. Los genes ribosomales están más conservados que la mayoría de los genómicos y, por lo tanto, ofrecen una mayor información taxonómica que las hibridaciones DNA-DNA. El hecho de que el gen 16S rRNA contenga a su vez regiones muy conservadas y regiones muy variables permite distinguir organismos a diferentes niveles filogenéticos. Empleando cebadores universales de regiones conservadas a ambos lados del gen, se puede amplificar mediante PCR el gen 16S rRNA de las bandas recortadas de un gel de DGGE o directamente de colonias crecidas en placa. El

producto amplificado se secuencian y se compara con otras secuencias recogidas en las bases de datos, permitiendo así una caracterización de estirpes desconocidas. Las bases de datos donde se introducen las secuencias analizadas para su identificación incluyen actualmente más de 3 millones de secuencias del gen 16S rRNA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA se emplea habitualmente para identificar la diversidad de la microbiota bucal y establecer las relaciones filogenéticas. Esta técnica ha servido para demostrar que la microbiota bucal está compuesta mayoritariamente por los taxones *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* (Zaura et al., 2009) y para identificar bacterias asociadas a ciertas enfermedades a partir de muestras de placa dental (Kumar et al., 2005). Sin embargo, la gran similitud en la secuencia del gen 16S rRNA entre especies del mismo género, como por ejemplo ocurre con muchas especies de *Lactobacillus*, hace que este método no siempre sea preciso para la identificación de especies muy relacionadas entre sí (Botina et al., 2006). Por eso también se emplea la secuenciación de la región intergénica entre los genes del 16S y el 23S rRNA ya que contiene un gran número de genes tRNA variables (Gurtler y Stanisich, 1996; Tannock et al., 1999).

1.4.5. Metagenómica

La revolución genómica actual se entiende como el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de genomas completos, lo cual ha dado un nuevo sentido al análisis de poblaciones bacterianas, ya que el conocimiento del total de los genes contenidos dentro del genoma de una especie permite estudiar características fisiológicas y ecológicas desconocidas hasta ahora. La metagenómica representa una aproximación totalmente nueva al estudio de las poblaciones microbianas, definida como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos colectivos contenidos en una muestra ambiental, basándose ya sea en expresión o secuenciación (Handelsman, 2004). La propiedad más valiosa de la metagenómica es la de proporcionar la capacidad de caracterizar de forma global la diversidad genética presente en dichas muestras, obviando las dificultades encontradas en el cultivo en laboratorio de determinados microorganismos. El análisis de genomas completos se hace construyendo librerías de clones. Esto conlleva la amplificación por PCR de la casi totalidad de los genes y posterior secuenciación. A continuación, mediante programas informáticos, las secuencias se alinean y se genera un árbol filogenético en el que las secuencias quedan

agrupadas en OTUs (unidades taxonómicas operativas). La comparación de microbiomas entre poblaciones diferentes se realiza, por tanto, comparando los datos de las librerías de clones (Li et al., 2008). En un estudio reciente a partir del DNA de muestras de saliva de 120 personas sanas de 12 localizaciones geográficas a lo largo de todo el mundo, se obtuvieron y secuenciaron 14.115 secuencias parciales del 16S rRNA. Estas secuencias fueron asignadas a 101 géneros bacterianos conocidos, de los cuales 39 no se sabía de su presencia en la cavidad oral humana, mientras que el análisis filogenético sugiere que están presentes otros 64 géneros desconocidos. Los resultados han indicado que existe una gran diversidad en el microbioma de la saliva humana y un alto nivel de variación interindividual. La investigación de algunas variables ambientales reveló una asociación significativa entre las distancias genéticas entre los individuos y la distancia de sus lugares de procedencia con el ecuador terrestre (Nasidze et al. 2009). Las principales ventajas de estos métodos sobre las técnicas tradicionales de amplificación genética son: un menor sesgo taxonómico en la secuenciación y la capacidad de analizar simultáneamente la taxonomía y funcionalidad de una misma comunidad. Una de las limitaciones más obvias de la metagenómica se refiere a la ausencia de estandarización en las metodologías de obtención de datos, causando una enorme heterogeneidad en la información contenida en los análisis metagenómicos (Raes et al., 2007). Debido al uso de diferentes protocolos de extracción de DNA, de diferentes volúmenes de muestra, y por lo tanto del número de células por muestra y cantidad de DNA total utilizada en la secuenciación, la comparación entre metagenomas resulta actualmente muy difícil. Otro problema es la complejidad en el proceso de ensamblado del genoma o metagenoma, así como el alto coste del proceso.

2. OBJETIVO

Este trabajo persigue estudiar los potenciales efectos de los polifenoles del vino en la microbiota oral humana. Los estudios sobre los beneficios para la salud humana del consumo moderado de vino se han dirigido especialmente hacia la protección cardiovascular, por lo que se trata de un objetivo novedoso. La mayoría de los antecedentes en la bibliografía se refieren a estudios realizados en el ecosistema del colon, donde los compuestos fenólicos son extensamente metabolizados. No obstante, los polifenoles podrían modular la microbiota bacteriana de la boca de forma beneficiosa. Por lo tanto, y como una primera aproximación a los efectos del consumo

de vino en la microbiota humana, se ha evaluado mediante un estudio de intervención en humanos, la posible modificación de la microbiota de la cavidad bucal tras el consumo de vino.

Partiendo de muestras de saliva de los individuos incluidos en el estudio, el procedimiento desarrollado se ha basado en el análisis de los perfiles de huella genética obtenidos por la amplificación por PCR de secuencias del 16S rRNA específicas de género de bacterias presentes en la cavidad bucal humana, y separadas por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). A partir de estos perfiles se procedió a la secuenciación de las bandas de interés separadas en estos geles. También se ha llevado a cabo la cuantificación de la población microbiana bucal mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR), utilizando SYBR Green como emisor de fluorescencia y oligonucleótidos cebadores universales para bacterias totales diseñados a partir del gen 16S rRNA de *E. coli*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio de intervención con vino en humanos

Para la realización del estudio de intervención en humanos mediante consumo moderado de vino, se seleccionó una población sana y de edad homogénea. Los voluntarios fueron reclutados en el Servicio de Salud Laboral del Hospital Ramón y Cajal. Los resultados obtenidos en la analítica sanguínea realizada como revisión anual de los voluntarios sirvieron para descartar la existencia de enfermedades graves de base.

Como criterios de inclusión en el estudio, se determinó que los participantes pertenecieran a ambos sexos, tuvieran una edad comprendida entre 25 y 45 años, fueran no fumadores, no hubieran recibido antibióticos u otro tratamiento médico por lo menos durante 6 meses antes del estudio y no padecieran de enfermedades o trastornos intestinales. Adicionalmente, no deberían haber usado antisépticos orales durante los 30 días previos al estudio, ni padecer de ninguna enfermedad sistémica que pudiera alterar la cantidad y composición de la placa dental o saliva.

El estudio de intervención se estructuró en dos partes, periodo de lavado y periodo de intervención con vino tinto. Durante el período de lavado (primeros 15 días), los voluntarios (consumidores y controles) no ingirieron ninguna bebida alcohólica ni alimentos de alto contenido en polifenoles (café, té, cacao, frutos rojos, etc.). Después de esos 15 días, se recogió una muestra de saliva. Durante las siguientes 4 semanas, los

voluntarios consumidores ingirieron una cantidad de 250 ml/día del vino tinto joven con elevado contenido fenólico (polifenoles totales \cong 3500 mg ácido gálico/L), elaborado en la bodega Miguel Torres S.A, y evitaron el consumo de otros alimentos de contenido elevado en polifenoles. Una vez concluidas las 4 semanas de ingesta de vino, se recogió una nueva muestra de saliva. Los sujetos controles siguieron las mismas pautas que los voluntarios, con la excepción de no ingerir vino durante el tiempo del estudio.

3.2. Recogida de muestras

El procedimiento de recogida y tratamiento de las muestras de saliva consistió en la realización de un enjuague bucal profundo con una pequeña cantidad de agua, por la mañana y antes de ingerir alimentos. Esta saliva fue recogida en recipientes proporcionados por el Hospital Ramón y Cajal para esos fines. A partir de 15 ml del volumen total homogeneizado recogido por individuo, se procedió a su centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min, con el fin de obtener un sedimento celular concentrado, con el que realizar los diversos análisis propuestos para este estudio. Cada uno de los sedimentos obtenidos fue dividido en alícuotas de entre 20 y 25 μ l y conservado a una temperatura de -80°C en presencia de un fluido crioprotector (glicerol al 40%).

3.3 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA, las alícuotas del sedimento celular de saliva se mezclaron con 100 mg de bolas de vidrio (diámetro de 150-212 μ m) y 100 μ l de tampón fosfato sódico 50 mM. Las células se sometieron a rotura mecánica utilizando el equipo FastPrep (Bio 101; Savant Instruments, Holbrook, NY, USA), en tres ciclos de 45 s de agitación a una velocidad de 5,5 m/s. A continuación, se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm, 10 min, para desechar las bolas de vidrio y restos celulares. El DNA genómico total y posibles restos celulares presentes en el sobrenadante se incubaron a 70 °C en presencia de buffer de lisis comercial (Nucleo Spin) y se purificó empleando el sistema NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel Düren, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA fue eluido en un volumen de 50 μ l de la solución tampón proporcionada en el kit.

3.4. Incubación *in vitro* de sedimentos bacterianos de saliva con polifenoles de uva.

Con el objetivo de simular el efecto que genera la ingesta de polifenoles en la microbiota bucal humana, se realizó un ensayo de crecimiento *in vitro* de sedimentos bacterianos de saliva en presencia de Vitaflavan®, un extracto comercial de pepitas de uva con alto contenido en polifenoles, en particular en flaval-3-oles, aportado por el Dr. Piriou (Les Dérives Resiniques & Terpéniques, S.A., Francia). Las muestras de 20 µl de sedimento celular de saliva se inocularon en 5 ml de ZMB1, un medio de cultivo químicamente definido (Zhang et al., 2009) con glucosa al 0,4% como fuente de carbono, a los que se añadieron 0,5 mg/ml de Vitaflavan. Los cultivos se incubaron en condiciones aerobias y anaeróbicas (en una cámara de anaerobiosis) a 37 °C durante 24 horas. Tras la incubación, las bacterias se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min y el DNA genómico total fue extraído como se indica en el apartado 3.3 para su posterior análisis por PCR-DGGE.

3.5. Análisis por PCR-DGGE

3.5.1. Amplificación de DNA y preparación de geles de gradiente desnaturalizante.

La calidad y cantidad de DNA genómico total extraído de las muestras de saliva fue medida con un espectrofotómetro UV a 260 nm y 280 nm. (BIORAD Smart Spec Plus Spectrophotometer). Se llevó a cabo la amplificación de regiones variables del gen 16S del RNA ribosomal bacteriano mediante PCR con cebadores universales para la evaluación de la microbiota total y mediante PCR específica de género. Los cebadores específicos se muestran en la Tabla 1 y corresponden a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria* y al grupo *Prevotella/Porfiromonas/Bacteroides*. A uno de los cebadores de cada pareja de PCR se le adicionó una cola de GC de 40 pb (5' CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C-3'), con el fin de que los productos de amplificación pudieran ser separados por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). La reacción de PCR para un volumen de 50 µl, se llevó a cabo empleando 100 ng del DNA genómico, 0,2 µmol de cada primer, 0,2 mM de una mezcla de oligonucleótidos (dNTP), 3 mM de MgCl₂, buffer Taq al 1×, y 2,5 U de enzima DNA-Polimerasa Taq (Invitrogen). El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C durante 2 min, entre 35 y 45 ciclos de 30 s a la temperatura de anillamiento adecuada para cada pareja de

cebadores (Tabla 1), 40 s a 56 °C y 20 s a 72 °C, seguido de una extensión final de 72 °C durante 5 min. Para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se llevo a cabo una Nested PCR, que aumenta la especificidad de los productos de la reacción. Los productos de amplificación (5 µl) se separaron en un gel de agarosa al 0,8% y se analizaron por DGGE.

La DGGE se llevó a cabo con un equipo DCode system (Bio-Rad Lab., USA), empleando un gel de poliacrilamida al 9% y un gradiente específico para la correcta separación de bandas de cada género (Tabla 1). El gradiente va aumentando en el sentido del avance de la electroforesis, donde el 100% desnaturizante corresponde a 7 M de urea y 40% (v/v) de formamida. Para la electroforesis, se empleó tampón 0,5× TAE (20 mM Tris, 10 mM ácido acético y 0,5 mM EDTA), a 70 V y 60 °C durante 16 horas.

Tabla 1. Lista de cebadores para DGGE utilizados en este estudio.

Microorganismos	Secuencia 5'-3'	Temp anillamiento(°C)	Gradiente (%)	Referencia
Total bacteria	F:AACGCGAAGAACCTTAC+GC R:CGGTGTGTACAAGACCC	56	30-60	Nubel et al. (1996)
<i>Lactobacillus</i>	F:GGAAACAGGTGCTAATACCG R:ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC+GC	56	30-50	Heilig et al. (2002)
	F:GTTTGATCCTGGCTCAG R:CACCGCTACACATGGAG	66	nested	
<i>Bifidobacterium</i>	F:GGGTGGTAATGCCGGATG R:GCCACCGTTACACGGGAA+GC	62	40-55	Satokari et al. (2000)
	F:CGGGTGCTICCCACTTTCATG R:GATTCTGGCTCAGGATGAACG	57	nested	
<i>Streptococcus</i>	F:AGATGGACCTGCGTTGT+GC R:GTGAACTTCCACTCTCACAC	55	25-50	Van den Borget et al (2011)
<i>Veillonella</i>	F:A(C/T)CAACCTGCCCTTCAGA R:CGTCCCGATTAACAGAGCTT+GC	62	40-70	Rinttilä et al. (2004)
<i>Neisseria</i>	F:CTGGCGCGGTATGGTCGGTT R:GCCGACGTTGGAAGTGGTAAAG+GC	55	30-70	Lansac et al. (2000)
<i>Prevotella, Porphyromonas, Bacterioides</i>	F:GAACGCTAGCTACAGGCTT+GC R:CCAATGTGGGGACC	58	40-58	Noor et al.(2010)

Cola de GC: CGCCGCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC

C/T = Y

A/T = W

3.5.2. Revelado de los geles

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con AgNO₃ según describen Sanguinetti, et al. (1994). Para ello, las muestras se fijaron con una solución de ácido acético glacial 0,5% (v/v) y etanol 10% (v/v) durante 3 min antes de teñir los geles de poliacrilamida con una solución de nitrato de plata al 0,2% (p/v) durante aproximadamente 10 min. A continuación, se lavaron los geles con agua destilada.

Posteriormente, se incubó el gel en solución de revelado (hidróxido sódico 1,5%, formaldehído 0,3% y una punta de espátula de borohidruro de sodio) hasta la visualización de las bandas. Después de la tinción, los geles se incubaron en solución fijadora durante 5 min, lavados con agua destilada 2 min e incubados en solución preservadora 7 min con el fin de mantener un registro permanente del experimento. Finalmente, los geles se colocaron en una placa de cristal cubiertos con papel transparente y se dejaron secar al menos durante 24 horas. Los geles se fotografiaron con una cámara COHU High Performance CCD Camera (Gelprinter).

3.6. Recuperación de bandas de PCR-DGGE y secuenciación

Para la recuperación de los amplicones de interés de los geles de poliacrilamida, las bandas obtenidas mediante PCR-DGGE se seleccionaron y se escindieron del gel de poliacrilamida con la ayuda de una lámina de bisturí quirúrgico esterilizada. Estas bandas se incubaron en 100 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y Triton® X-100 0,1%, pH 9, a 95 °C durante 20 min. Después de centrifugar las muestras durante 1 min a 13000 rpm, se reamplificó 1 µl del DNA eluido de cada banda de DGGE siguiendo las condiciones ya descritas en el apartado 3.5. Se utilizaron los cebadores apropiados (Tabla 1) sin la secuencia rica en GC en el extremo 5', necesaria sólo para separar los fragmentos amplificados en DGGE. Los fragmentos amplificados por PCR se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5%. Finalmente, se purificaron los productos amplificados utilizando el Kit Qiaquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid. Posteriormente se analizaron las secuencias empleando un programa adecuado (DNASstar Inc., USA) y fueron identificadas por BLAST mediante el uso de bases de datos de nucleótidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.7. PCR cuantitativa en tiempo real (RTi-PCR)

3.7.1. Obtención de la curva de calibrado y evaluación de la eficiencia de los cebadores empleados

Para la cuantificación por RTi-PCR de bacterias totales en la saliva de los sujetos sometidos al estudio, antes y después del consumo de vino, se utilizó una curva de calibrado con diluciones decimales de DNA obtenido a partir de una cantidad

conocida de células de un cultivo puro de *Escherichia coli* DH5 α . Para ello, se creció a esta cepa en caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C, en condiciones de aerobiosis y con agitación constante (200 rpm). Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento (15 h), se tomaron muestras para llevar a cabo el recuento en placa y la extracción de DNA. Para los recuentos en placa, se tomó 1 ml de cultivo, se diluyó en solución salina (0,85 %) y se plaqueó sobre agar LB (caldo LB al que se le añadió agar bacteriológico al 1,5 %), extendiendo la incubación a 37 °C durante 24 h. Para la extracción del DNA, se empleó el procedimiento descrito en el apartado 3.3. Tras la obtención del DNA purificado, se prepararon las diluciones decimales empleadas en la curva de calibrado, correspondiéndose con una concentración de 10⁷, 10⁶, 10⁵ y 10⁴ unidades formadoras de colonia (ufc) por ml de cultivo puro, respectivamente.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados, 968-GC-Forward (5'- AAC GCG AAG AAC CTT AC- 3') y Uni-1401-Reverse (5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC -3'), fueron descritos por Nübel et al. (1996), y se diseñaron a partir del gen 16S rRNA de *E. coli*. Para determinar la capacidad de los cebadores para cuantificar el DNA bacteriano total por RTi-PCR, se calculó la eficiencia de la reacción, basada en la capacidad de los cebadores para duplicar el número de amplicones obtenidos en cada ciclo de amplificación. Además, se verificó mediante el análisis de la curva de fusión (melting) que los cebadores no formaban dímeros entre sí, aspecto especialmente relevante cuando el agente intercalante de DNA empleado es SYBR Green.

3.7.2. Reacción de RTi-PCR

Para la reacción de RTi-PCR se utilizaron 2 μ l del DNA, 0,4 μ l de cada uno de los cebadores específicos (10 μ M) y 10 μ l de la mezcla maestra KAPA SYBR FAST Master Mix (KAPA Biosystems), completando el volumen de reacción hasta 20 μ l con agua milliQ estéril. La reacción se llevó a cabo en un equipo iQTM5 Multicolor Real-Time PCR detection system Cyclor (BIO-RAD). El protocolo de PCR fue: desnaturalización previa de DNA a 94 °C (2 min), seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 s) y de hibridación y elongación a 56 °C (40 s). Las medidas de fluorescencia se realizaron en cada ciclo en el paso de hibridación y elongación. Para detectar posibles productos inespecíficos y/o la aparición de dímeros de cebadores se programó al final de cada reacción de RTi-PCR una curva de melting entre 56 y 95 °C (0,5 °C/s).

3.7.3. Análisis de los datos obtenidos mediante RTi-PCR

Cada reacción de RTi-PCR va asociada a un ciclo umbral (C_T), definido como el ciclo en el que se empieza a detectar un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base. En este estudio, la señal de base que se estableció como óptima fue la generada automáticamente por el software del equipo de RTi-PCR. Los valores C_T de las muestras problema obtenidos por RTi-PCR, sirvieron para cuantificar el número de bacterias (ufc/ml) presentes en la saliva de los individuos por extrapolación a partir de la curva de calibrado obtenida con *E.coli* DH5 α con cantidad conocida de células. La pendiente de la curva de calibrado fue usada para calcular la eficiencia (E) de reacción de RTi-PCR, usando la siguiente ecuación (Klein et al., 1999) $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$. Todas las reacciones de RTi-PCR fueron llevadas a cabo por triplicado para la curva patrón y por duplicado para cada muestra, y las diferencias se compararon en un nivel de significancia de 0,05 mediante la prueba de comparación *t* de Student utilizando el programa Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE.UU.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización en el tratamiento de muestras de saliva y extracción del DNA

Para el desarrollo del objetivo de este estudio, hubo que seleccionar un método óptimo para la extracción de DNA de los sedimentos celulares de saliva procedente de los individuos incluidos en el estudio de intervención con vino. Se compararon varios procedimientos que permitieran la obtención del máximo de cantidad de DNA con la mayor diversidad bacteriana posible. El punto crítico a valorar en la puesta a punto de la técnica fue el diferente comportamiento bacteriano a la lisis celular. Teniendo en cuenta la complejidad de las muestras y la posible presencia de material genético de origen eucariota, tras la extracción de DNA se realizó una PCR-DGGE utilizando cebadores universales para bacterias totales (Tabla 1), con el fin de evaluar el método que proporcionaba mejor rendimiento en DNA y mayor diversidad bacteriana.

Se ensayó la utilización del tampón de lisis descrito por Zijnga et al. (2006) que contiene dodecilsulfato sódico (SDS) y proteinasa K. El SDS es un compuesto tensoactivo iónico que ayuda a solubilizar los constituyentes membranosos celulares y destruir la envoltura celular rompiendo los enlaces no covalentes y desnaturalizando las proteínas. La proteinasa K, activa a 58 °C, degrada las proteínas y

enzimas que pueden potencialmente agregarse al DNA y ayuda a limpiar la muestra. Para potenciar la lisis celular se aplicaron tres ciclos de choque térmico (15 min a -80°C seguido de 5 min a 80°C). La extracción de DNA se completó mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol en el primer método ensayado. En el segundo método, la extracción de DNA se realizó utilizando una columna del kit comercial Nucleo Spin Tissue en lugar de fenol-cloroformo. La concentración de DNA obtenida en los dos casos fue entre 32 y 40 ng/μl. Por lo tanto, no se observaron diferencias entre los dos métodos de recuperación del DNA.

Con el fin de obtener mayor concentración de DNA, se probó, en tercer lugar, el uso de un tampón de lisis más agresivo, que contenía EDTA, Triton X-100, lisozima y proteinasa K, y los tres ciclos de choque térmico mencionados anteriormente. El DNA también se recuperó con la columna del kit Núcleo Spin Tissue, debido al menor requerimiento de tiempo con respecto a la recuperación de DNA con fenol-cloroformo, ya que no se habían encontrado diferencias entre los dos métodos de purificación del DNA. La concentración de DNA obtenida fue de 93 ng/μl. Cuando se suprimían los 3 ciclos de choque térmico en el procedimiento de lisis, se obtenían cantidades muy bajas de DNA (0,97 ng/μl).

El método de lisis bacteriana denominado Repeated Bead Beating, caracterizado por el uso de esferas de vidrio de pequeño diámetro para conseguir una fricción que destruya las envolturas celulares, ha sido aplicado para la extracción del DNA de muestras fecales bovinas (Yu y Morrison 2004) y humanas (Salonen et al 2010), obteniéndose buenos resultados en cantidad y diversidad de DNA de las poblaciones bacterianas obtenidas. Se aplicó este método de lisis a las muestras de saliva y la obtención de DNA se realizó siguiendo el procedimiento de extracción con el kit Nucleo Spin Tissue. Con este procedimiento se obtuvieron las mayores concentraciones de DNA (126 ng/μl).

En relación a la diversidad bacteriana recuperada con los diferentes procedimientos de extracción de DNA, el perfil de bandas obtenido por PCR con cebadores de bacterias universales y separadas por DGGE del DNA procedente de cada uno de los métodos de lisis y extracción de DNA ensayados mostró mayor diversidad e intensidad de bandas en las muestras procedentes de la lisis por el método de fricción con bolas de vidrio (Repeated Bead Beating). Estos resultados nos permitieron escoger este método de extracción como el más adecuado para el estudio de diversidad bacteriana de las muestras de saliva humana.

4.2. Modulación *in vitro* de la microbiota bucal con extractos fenólicos

Con el objeto de evaluar el potencial modulador de los polifenoles presentes en el vino sobre la microbiota bucal humana, se hizo un estudio previo de incubación de sedimentos celulares procedentes de saliva humana con un extracto rico en polifenoles procedente de pepitas de uva (Vitaflavan). Para las incubaciones se utilizó un medio de cultivo químicamente definido (ZMB1), que permite el crecimiento de un gran número de especies bacterianas (Marcobal et al., 2010; Tabasco et al., 2011). La respuesta de crecimiento bacteriano a la presencia del extracto de polifenoles fue evaluada por PCR-DGGE. En la Tabla 2 se muestran los compuestos fenólicos que constituyen el extracto utilizado. El contenido total es de 337 mg/g y los principales componentes son ácido gálico, flavan-3-oles monoméricos [(+)-catequina y (-)-epicatequina], procianidinas diméricas (B1, B2, B3 y B4) y triméricas (C1 y T2), (-)-epicatequina-3-*O*-galato y procianidin-galatos (B1-3-*O*-galato, B2-3-*O*-galato, y B2-3'-*O*-galato). La Fig. 2 muestra los perfiles de bandas amplificadas con los cebadores universales para bacterias totales y separadas mediante DGGE en geles de gradiente de desnaturalización 40-60% y 30-60%. Se muestran los resultados de los perfiles de bandas amplificadas procedentes del sedimento celular de saliva de partida y después de la incubación a 37 °C en aerobiosis y anaerobiosis en presencia o no de Vitaflavan. Los resultados indican la presencia de tres bandas mayoritarias, que varían en intensidad según la presencia o ausencia del extracto fenólico en las incubaciones. Estas bandas fueron secuenciadas y los resultados de homología de las secuencias nucleotídicas obtenidas indicaron que se corresponden con *Streptococcus salivarius* (banda 1), *Neisseria flavescens* (banda 2) y *Haemophilus parainfluenzae* (banda 3). Tanto *Streptococcus*, *Neisseria* como *Haemophilus* pertenecen a tres de los géneros bacterianos mayoritarios en la microbiota oral (Zaura et al., 2009; Tian et al., 2010). Un estudio de la microbiota de la lengua en individuos con halitosis ha demostrado que *S. salivarius* (ausente en la halitosis), es uno de los organismos de mayor prevalencia en el dorso de la lengua (Kazor et al, 2003). *N. flavescens* es un miembro generalmente no patógeno del grupo de *Neisseria*, es normalmente un saprofita de la boca, nasofaringe y del tracto respiratorio superior asociado con un estado bucal libre de caries (Crielaard et al., 2011).

Tabla 2. Concentración en compuestos fenólicos del extracto Vitaflavan®

Compuestos fenólicos	mg/g (\pm SD)
Ácido galico	9,11 \pm 0,10
Procianidina B3	20,39 \pm 0,33
Procianidina B1	60,99 \pm 1,42
(+)-Catequina	74,57 \pm 0,09
Procianidina T2	6,81 \pm 0,06
Procianidina B4	15,04 \pm 0,13
Procianidina B2	45,13 \pm 0,95
B1-3- <i>O</i> -galato	0,32 \pm 0,04
(-)-Epicatequina	67,68 \pm 0,75
B2-3- <i>O</i> -galato	1,80 \pm 0,06
Procianidina C1	7,07 \pm 0,08
B2-3'- <i>O</i> -galato	1,61 \pm 0,00
(-)-Epicatequina-3- <i>O</i> -galato	26,21 \pm 0,41

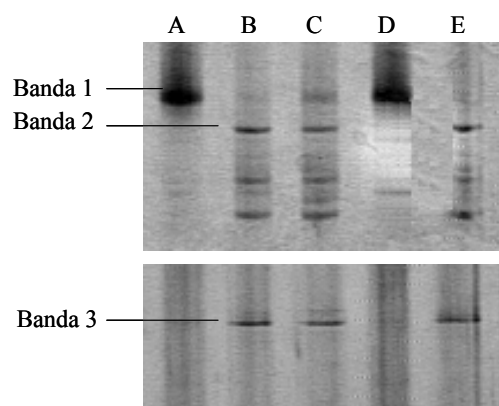


Fig. 2. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gel superior: gradiente 40-60%; gel inferior: gradiente 30-60%) de los productos obtenidos por PCR, empleando los cebadores universales de bacterias totales, del DNA de la saliva procedente de: (A) cultivo en aerobiosis sin vitaflavan; (B) sedimento celular de partida; (C) cultivo en aerobiosis con vitaflavan; (D) cultivo en anaerobiosis sin vitaflavan; (E) cultivo en anaerobiosis con vitaflavan. Las bandas señaladas corresponden a *Streptococcus salivarius* (banda 1), *Neisseria flavescens* (banda 2) y *Haemophilus parainfluenzae* (banda 3).

La presencia mayoritaria en los geles de PCR-DGGE de la banda correspondiente a *S. salivarius* tras las incubaciones de los sedimentos celulares de saliva en ausencia de Vitaflavan, que indica el mayor crecimiento de esta especie en el cultivo *in vitro*, puede asociarse al hecho de que el medio ZMB1 fue desarrollado para lactococos, estreptococos y enterococos (Zhang et al., 2009). Es llamativo el hecho de que la presencia de Vitaflavan en las incubaciones favorece el mantenimiento de una mayor diversidad de bandas, ya que el perfil bacteriano observado en los cultivos con Vitaflavan es más similar al del sedimento celular sin incubar que al de las incubaciones sin Vitaflavan. Este resultado podría explicarse por la mayor sensibilidad de los estreptococos a los polifenoles presentes en el Vitaflavan, mientras que la población de *Neisseria* y *Haemophilus* se vería menos afectada. El efecto inhibitorio sobre *S. salivarius* y *S. thermophilus* de los flavan-3-oles presentes en Vitaflavan ha sido descrito previamente en el grupo de investigación (Tabasco et al., 2011). En este estudio, también se observó que las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se vieron menos afectadas por la presencia de estos compuestos que los estreptococos. De igual manera, las bacterias Gram negativas parecen verse menos inhibidas por estos compuestos que las Gram positivas (Cueva et al., 2010). Esto explicaría que *Neisseria* (Gram negativa) y *Haemophilus* (Gram negativa) no se vieran aparentemente afectados por la incubación de la saliva con Vitaflavan.

4.3. Perfiles microbianos de saliva obtenidos por PCR-DGGE. Consecuencias del consumo moderado de vino

Un total de dieciséis individuos participaron en el estudio de intervención en humanos, de los cuales diez consumieron vino de forma moderada durante cuatro semanas y los otros seis se mantuvieron como controles negativos. A partir de las muestras de saliva recogidas de todos los individuos al final del periodo de lavado y al final del ensayo, se analizaron los perfiles de PCR-DGGE obtenidos con cebadores universales de bacterias totales y específicos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria* y el grupo *Prevotella/Porfiromonas/Bacteroides* (Tabla 1). Para la separación de bandas procedentes de bacterias totales, se realizaron geles con distintos gradientes de urea-formamida (30-60%, 20-70% y 40-70%) a fin de obtener las condiciones que proporcionaran la mejor separación posible de bandas y visualización de los perfiles bacterianos. En la Fig. 3 se muestran los perfiles de bandas

obtenidas con los cebadores de bacterias totales separadas con un gradiente 20-70%. Se muestran los resultados obtenidos de 8 de los individuos al final del periodo de lavado (a) y después (d) del periodo de consumo de vino. Los resultados muestran unos perfiles similares en todos los casos, sin aparentes diferencias en las poblaciones bacterianas atribuibles al consumo de vino. La Fig. 4 muestra los perfiles obtenidos con el gradiente 30-60% para el mismo grupo de individuos. En estas condiciones, los resultados mostraron una mayor diversidad de bandas, pero tampoco se encontraron variaciones evidentes de los grupos bacterianos debidas al consumo de vino. En general, la variabilidad de bandas observadas entre individuos fue mayor que la asociada al consumo de vino. Como se ha descrito anteriormente, la cavidad bucal es un hábitat repleto de microorganismos. No todas las especies que residen en la saliva se han identificado, y se prevé la existencia de alrededor de 750 especies diferentes (Jenkinson y Lamont, 2005; Paster et al, 2006). La dificultad de identificación reside en que muchas no son cultivables y además presentan similitudes genómicas. Por ello, muchas investigaciones están dirigidas a la identificación de genomas completos de microorganismos representativos de la comunidad bucal: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Lactobacterium*, *Eubacteria*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium* (Jenkinson y Lamont, 2005; Wilson, 2005).

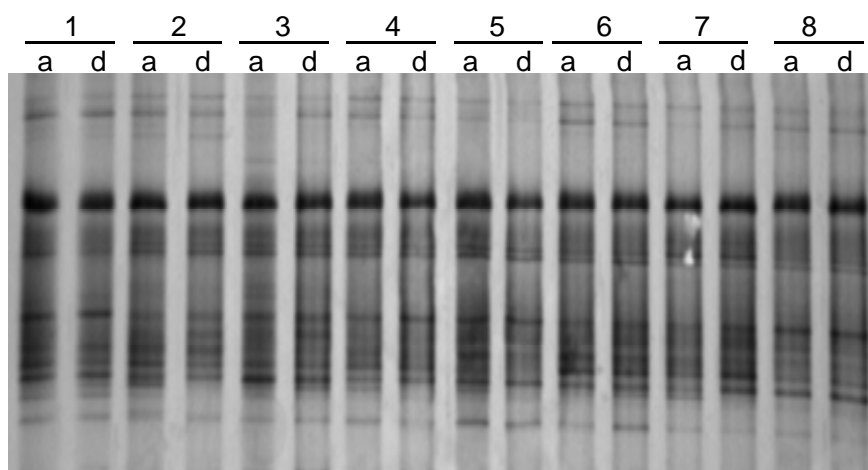


Fig. 3. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (gradiente 20-70%) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de ocho individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores universales de bacterias totales.

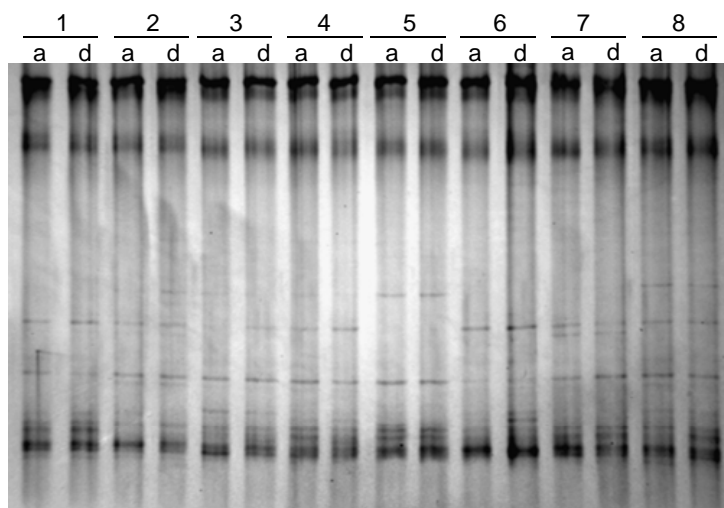


Fig. 4. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gradiente 30-60%) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de ocho individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino (carriles 1, 2, 3 y 8) empleando los cebadores para bacterias totales. Carriles 4, 5, 6 y 7: controles negativos.

Con el objeto de evaluar el efecto del consumo de vino en grupos bacterianos concretos, se llevó a cabo el estudio de PCR-DGGE empleando cebadores específicos para los grupos bacterianos mayoritarios de la saliva. Además se realizó el estudio del efecto sobre *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* por su potencial papel probiótico. La Fig.5 muestra los perfiles de bandas amplificadas con los cebadores específicos para el género *Bifidobacterium* y separadas mediante DGGE (gradiente 40-55%). Se muestran los resultados procedentes de muestras de saliva de 8 individuos al final del periodo de lavado (a) y después del consumo de vino durante 4 semanas (d). Los resultados indican la presencia de tres bandas predominantes en la mayoría de individuos, aunque no parece existir una aparente relación entre el consumo de vino y los perfiles de bandas observadas. Las diferencias encontradas indican, por tanto, mayor variabilidad entre individuos que la que podría asociarse al consumo de vino. Las tres bandas fueron secuenciadas y los resultados de homología de las secuencias nucleotídicas obtenidas indicaron que se corresponden con *Bifidobacterium dentium* (banda 2) y con clones de *Bifidobacterium* no cultivados (banda 3). La banda 1 se identificó como *Alloscardovia omnicolens*. Esta especie ha sido descrita recientemente por Huys et al. (2007) y pertenece a la familia *Bifidobacteriaceae*. Dentro de esta familia, *A. omnicolens*, *B. dentium*, *Bifidobacterium longum*, *Scardovia inopinata* y *Parascardovia denticolens* son las especies habitualmente asociadas a la saliva humana (Beighton et al., 2008).

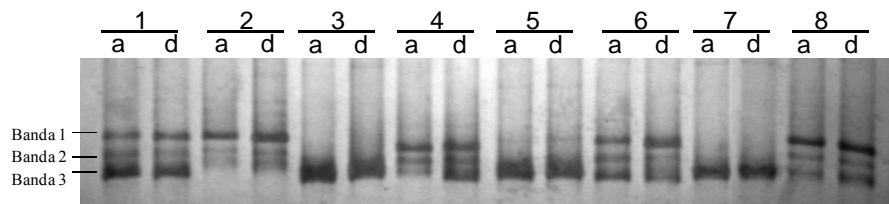


Fig. 5. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gradiente 40-55%) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de ocho individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores específicos para el género *Bifidobacterium*. Las bandas señaladas corresponden a *Alloscardovia omnicolens* (banda 1), *Bifidobacterium dentium* (banda 2) y clones de *Bifidobacterium* no cultivados (banda 3).

Los perfiles de bandas específicas del género *Lactobacillus* obtenidas por PCR-DGGE se muestran en la Fig. 6. Los resultados indican una elevada homogeneidad de especies presentes en saliva entre los individuos analizados, con la aparición de 4 bandas mayoritarias, sin que se observen cambios aparentes relacionados con el consumo de vino. El número de especies de lactobacilos encontradas en saliva humana varía habitualmente entre cuatro y ocho especies diferentes, siendo *L. vaginalis*, *L. oris*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *L. casei* las principales especies identificadas en saliva (Yang et al., 2010). La presencia de lactobacilos en la saliva humana se ha relacionado tradicionalmente con la aparición de caries dental, debido a su capacidad fermentativa de azúcares (Caufield et al., 2007).

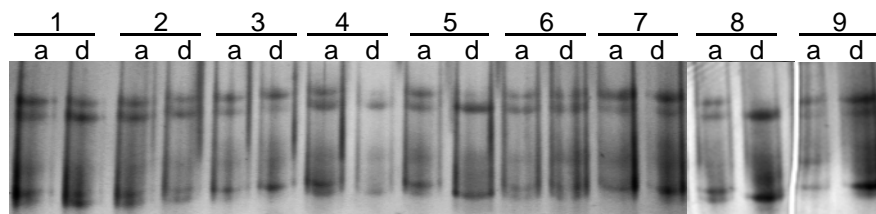


Fig. 6. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gradiente 30-50%) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de nueve individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores específicos para el género *Lactobacillus*.

La Fig. 7 muestra los perfiles de bandas amplificadas con los cebadores específicos del género *Streptococcus*. Los resultados indican una gran abundancia de especies de este género en las muestras de saliva. No es de extrañar este resultado, debido a que *Streptococcus* se corresponde con uno de los géneros predominantes de la microbiota bucal (Aas et al., 2005; Ciric et al., 2010; Tian et al., 2010). Sin embargo, los perfiles de bandas obtenidos entre los individuos reflejan cierta uniformidad de las especies presentes y poca variación atribuible al consumo de vino. La banda mayoritaria y presente en todos los individuos se identificó como perteneciente al grupo *S. mitis*-*S. oralis*, que se corresponde con estreptococos del grupo viridans. Dentro de este grupo se encuentran varias especies predominantes en la cavidad bucal. *S. sanguis* y *S. mitis* biovar 1, están presentes en la mucosa bucal y junto con *S. oralis* están asociadas a la formación inicial de la placa dental. Dentro de este grupo también se engloba *S. gordonii*, que anteriormente formaba parte de *S. sanguis*, y que habitualmente se encuentra en pequeñas cantidades en la mucosa orofaríngea y en la placa supragingival madura. En el dorso de la lengua prevalecen *S. mitis* biovar 2 y *S. salivarius*, esta última especie predomina también en la mucosa faríngea, mientras que *S. anginosus* es más habitual en la placa subgingival (Frandsen et al., 1991).

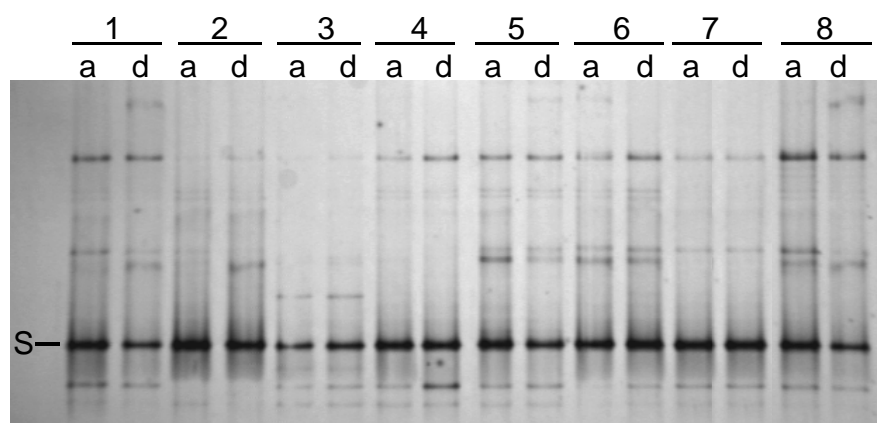


Fig. 7. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gradiente 25-50 %) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de ocho individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores específicos para el género *Streptococcus*. La banda mayoritaria (S) pertenece al grupo *S. mitis*-*S. oralis*.

Los perfiles de bandas específicas del género *Veillonella* obtenidas por PCR-DGGE se muestran en la Fig. 8. Los resultados muestran una gran abundancia de bandas, correspondientes a distintas especies de este género, que coincide con el hecho de que *Veillonella* sea uno de los grupos mayoritarios presentes a lo largo de toda la cavidad bucal (Aas et al., 2005). En general, se observa una banda de gran intensidad coincidente en todos los sujetos y una mayor variabilidad interindividual que la asociada al consumo de vino.

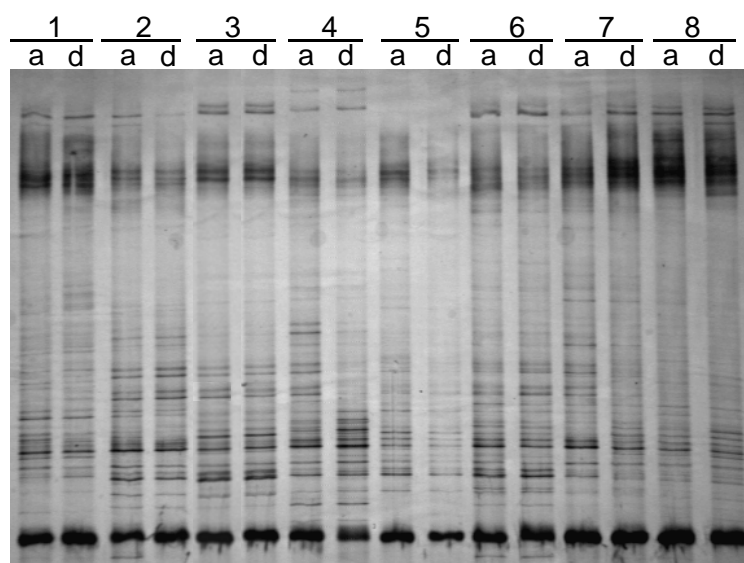


Fig. 8. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gradiente 40-70 %) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de ocho individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores específicos para el género *Veillonella*.

El estudio de *Neisseria* en los individuos incluidos en el estudio de intervención en humanos también refleja gran abundancia de especies correspondientes a este género. En la Fig.9 se muestran los perfiles de bandas amplificadas con los cebadores específicos para el género *Neisseria*. Los resultados procedentes de muestras de saliva de 8 individuos al final del periodo de lavado (a) y después del consumo de vino durante 4 semanas (d) muestran ciertas diferencias en la intensidad de la bandas, pero no es destacable la variación de bandas asociadas al consumo de vino. Nuevamente observamos mayor variabilidad entre individuos que antes y después del periodo de consumo de vino. Un estudio sobre la estructura de la comunidad bacteriana en la saliva, sitúa a *Neisseria* como uno de los organismos asociados al estado de salud oral

en humanos (Ciric et al., 2010). Al mismo tiempo, Tian et al. (2010) atribuyen a este género el 15% de la presencia bacteriana en la saliva humana.

La Fig.10 muestra los perfiles de bandas amplificadas con los cebadores específicos para el grupo *Prevotella*, *Porphiromonas* y *Bacterioides*. Los cebadores empleados amplifican los tres géneros debido a la similitud en su secuencia del 16S rRNA, razón por la cual, en el pasado, algunas especies actualmente agrupadas en diferentes géneros se consideraban dentro del mismo género (Shah y Collins, 1990). El perfil de bandas obtenido muestra mayor variabilidad entre individuos que la atribuible al consumo de vino. Según relata un estudio realizado por Zaura et al. (2009), el taxón *Bacterioidetes*, al cual pertenecen los géneros *Prevotella*, *Porphiromonas* y *Bacterioides*, representa uno de los taxones mayoritarios del microbioma oral de individuos sanos. Tian et al. (2010) atribuyen a *Prevotella* en torno al 30-40% del total de las poblaciones de la microbiota de la saliva, mientras que *Porphiromonas* representa un 2-4%.

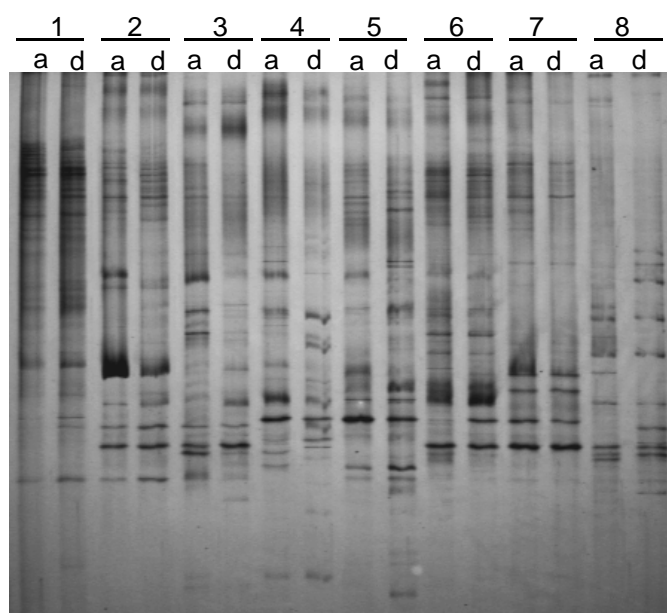


Fig. 9. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (gradiente 30-70%) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de ocho individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores específicos para el género *Neisseria*.

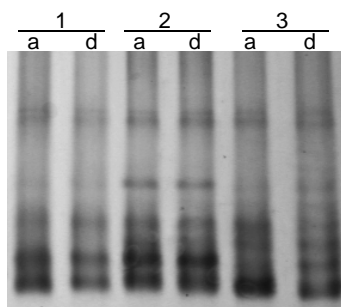


Fig. 10. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (gradiente 40-58%) de los productos obtenidos por PCR de la saliva de tres individuos antes (a) y después (d) del periodo de consumo moderado de vino empleando los cebadores específicos para el grupo de *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Bacterioides*.

4.4. Análisis de la curva de calibrado y eficiencia de los cebadores empleados en la RTi-PCR

Con el fin de cuantificar la microbiota de la saliva de los individuos incluidos en el estudio de intervención con vino, se realizó una PCR a tiempo real (RTi-PCR) con las muestras de saliva utilizando cebadores universales de bacterias totales. El objetivo fue evaluar las posibles diferencias en cantidad de población bacteriana de la saliva asociadas al consumo moderado de vino, dado que no se han encontrado cambios evidentes a nivel cualitativo. Para ello, se elaboró una curva de calibrado a partir de una cepa pura de *E. coli*, con la que poder comparar los resultados obtenidos con las muestras de DNA de saliva. El análisis por RTi-PCR de las diluciones decimales del DNA procedente de cantidades conocidas de células a partir de un cultivo puro de *E. coli* DH5 α , generó una recta de calibrado con un valor de R^2 de 0,992 y una eficiencia de 0,84 (slope = -3,75). Estos valores fueron proporcionados por el software del equipo RTi-PCR utilizado (BIO-RAD) (Fig. 11). El análisis de las curvas de *melting* obtenidas para cada reacción no reveló la formación de ningún fragmento inespecífico que interfiriera durante la lectura de fluorescencia.

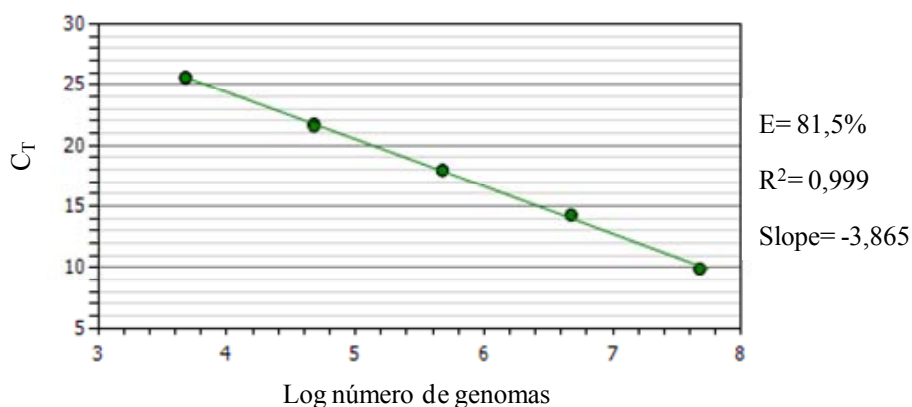


Fig. 11. Curva de calibrado de *Escherichia coli* para el cálculo por extrapolación del número de bacterias presente en la saliva. La eficiencia de los primers (E), el coeficiente de regresión lineal (R^2) y la pendiente (Slope) están representados en la figura.

4.5 Cuantificación de bacterias de la saliva por RTi-PCR

Los valores C_T de las muestras procedentes de 10 individuos antes y después del periodo de consumo de vino obtenidos por RTi-PCR, sirvieron para cuantificar el número de bacterias totales (número de copias de genomas/ml) en la saliva por extrapolación a partir de la recta de calibrado obtenida para *E. coli* DH5 α (Tabla 3.). Los resultados mostraron que tanto antes como después del periodo de cuatro semanas de consumo de vino, el número de copias de genomas bacterianos por ml de saliva analizado fue de media 10^8 . Este dato concuerda con el hecho de que en la saliva se haya estimado la presencia de 10^8 – 10^9 bacterias/ml de saliva (Carroll et al, 2009; GuRNAer y Malagelada, 2003).

Tabla 3. Recuentos (Log_{10} del número de copias del genoma/ml) de bacterias totales en la saliva de los individuos sometidos al estudio de intervención, antes y después del consumo de vino, analizados por RTi-PCR.

Individuos	Copias del genoma de bacterias por ml de saliva	
	Antes del consumo	Después del consumo
1	$8,46 \pm 0,03$	$8,86 \pm 0,04$
2	$8,19 \pm 0,01$	$7,92 \pm 0,07$
3	$7,81 \pm 0,08$	$7,59 \pm 0,01$
4	$7,79 \pm 0,05$	$7,07 \pm 0,06$
5	$8,05 \pm 0,01$	$8,03 \pm 0,06$
6	$7,04 \pm 0,02$	$7,61 \pm 0,01$
7	$7,84 \pm 0,02$	$8,32 \pm 0,16$
8	$8,15 \pm 0,01$	$7,58 \pm 0,01$
9	$8,23 \pm 0,03$	$8,08 \pm 0,03$
10	$8,82 \pm 0,01$	$8,99 \pm 0,01$

Expresado en $\text{Log}_{10} \pm$ Desviación estandar

El valor resultante del análisis estadístico de los resultados de RTi-PCR obtenidos de los recuentos de saliva procedentes de los individuos antes y después de la ingesta de vino, mediante la prueba t de Student, $n-1$ grados de libertad y 95% de nivel de confianza, fue inferior al valor tabulado de t , lo que indica que no hubo diferencias significativas entre el número de bacterias totales obtenido antes y después del consumo moderado de vino. Esto hace pensar que no existe una relación directa entre el consumo moderado de vino y la cantidad de bacterias totales en la saliva. Sin embargo, dadas las diferencias de intensidad de algunas bandas de los perfiles microbianos obtenidos por DGGE, se podría pensar en la existencia de diferencias cuantitativas entre géneros bacterianos asociadas al consumo de vino. Como se ha descrito anteriormente, existe un efecto inhibitor de los compuestos fenólicos sobre *S. salivarius* y *S. thermophilus* (Tabasco et al., 2011) y las bacterias Gram negativas parecen comportarse de manera distinta a las Gram positivas ante la presencia de este tipo de compuestos (Cueva et al., 2010). Teniendo en cuenta el efecto modulador sobre las poblaciones de *S. salivarius*, *N. flavescens* y *H. parainfluenzae* obtenidos en nuestro estudio *in vitro* (Fig. 2), sería interesante llevar a cabo estudios de PCR cuantitativa sobre los géneros más abundantes de la microbiota oral.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra los efectos del consumo moderado de vino sobre la microbiota de la saliva humana. Se han utilizado las técnicas de PCR-DGGE y RTi-PCR para la evaluación de los posibles cambios en los perfiles microbianos de huella genética de la población bacteriana mayoritaria en la saliva humana y en la cuantificación de la población total bacteriana. A partir de los resultados encontrados se han obtenido las siguientes conclusiones.

- A través de un estudio de incubación *in vitro*, se ha demostrado que el extracto fenólico de pepita de uva (Vitaflavan) puede potencialmente modular la microbiota oral humana. Se observa un efecto inhibitorio en *Streptococcus salivarius*, y ningún efecto aparente sobre *Neisseria flavescens* y *Haemophilus parainfluenzae*.

- Se ha demostrado a través de los perfiles de bandas obtenidas por PCR-DGGE, la existencia de diferentes patrones de comunidades bacterianas entre diferentes individuos que se mantiene estable y que aparentemente es independiente del consumo moderado de vino. La secuenciación de bandas de los perfiles de PCR-DGGE ha permitido completar la caracterización de poblaciones bacterianas presentes en la saliva humana.

- La cuantificación de la población total bacteriana de la saliva mediante RTi-PCR muestra la presencia media de 10^8 bacterias por ml de saliva en individuos sanos, independientemente del consumo moderado de vino.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., and Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5721-5732.
2. Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds. *Phytochemistry Reviews*, 7, 407-429.
3. Beighton, D., Gilbert, S.C., Clark, D., Mantzourani, M., al-Haboubi, M., Ali, F., Ransome, E., Hodson, N., Fenlon, M., Zoitopoulos, L., and Gallagher, J. (2008). Isolation and Identification of *Bifidobacteriaceae* from Human Saliva. *Applied and Environmental Microbiology*, 6457–6460
4. Bodet, C., Grenier, D., Chandad, F., Offek, I., Steinberg, D., and Weiss, E. I. (2008). Potential oral health benefits of cranberry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 672-680.
5. Botina, S G, Tsygankov Iu, D and Sukhodolets, V V (2006) Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing. *Genetika*, 42, 1621-1635.
6. Bradshaw D.J., Marsh P.D., Watson G.K., Allison C. (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and Immunity*, 66, 4729-4732.
7. Braga, R.R.R., Carvalho, M.A.R., Bruña-Romero, O., Teixeira, R.E., Costa J.E., Mendes E.N., Farias, L.M., Magalhães, P.P. (2010). Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real time polymerase chain reaction. *Anaerobe*, 16, 234-239.
8. Carroll, I. M., Threadgill, D. W., and Threadgill, D. S. (2009). The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mammalian Genome*, 20, 395-403.
9. Caufield, P.W., Li, Y., Dasanayake, A., Saxena, D. (2007). Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Research*, 41, 2–8.
10. Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A.A , Huse, S.M., Montijn, R.C., Keijser, B.J.F. (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Medical Genomics*, 4, 22.

11. Ciric, L., Pratten, J., Wilson, M. and Spratt, D (2010). Development of a novel multi-triplex qPCR method for the assessment of bacterial community structure in oral populations. *Environmental Microbiology Reports* 2, 6, 770–774.
12. Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., Rivas, C.L, Requena, T., Rodríguez, J.M., Bartolomé, B., 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol*, 161, 372–382.
13. Dávalos, A., and Lasunción, M. A. (2009). Health-promoting effects of wine phenolics. In M. V. Moreno-Arribas, and M. C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 571-591). New York: Springer.
14. de Jong MH, van der Hoeven JS. (1987). The growth of oral bacteria on saliva. *Journal and Dental Research*, 66, 498–505.
15. de Jong MH, van der Hoeven JS, van Os JH, Olijve JH. (1984) Growth of oral *Streptococcus* species and *Actinomyces viscosus* in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 901–904.
16. Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Spini, V., Dacarro, C. (2007). Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5038-5042
17. Donovan, J. L., Manach, C., Faulks, R. M., and Kroon, P. A. (2006). Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. In A. Crozier, M. N. Clifford, and H. Ashihara (Eds.), *Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet* (pp. 303-341). Oxford: Blackwell Publishing.
18. Duarte, S., Gregoire, S., Singh, A. P., Vorsa, N., Schaich, K., Bowen, W. H. (2006). Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 257, 50-56.
19. Fischer, S. G. and Lerman, L. S. (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 1579-1583.
20. Forester, S. C., and Waterhouse, A. L. (2009). Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *Journal of Nutrition*, 139, 1824S-1831S.
21. Frandsen, E. V. G., Pedrazzoli, V., Kilian, M. (1991) Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiology and Immunology*, 6, 129–133

22. Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 116-117.
23. Furiga, A., Lonvaud, A., and Badet, C. (2009). In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chemistry*, 113, 1037-1040.
24. Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 360, 512-519.
25. Guggenheim, B., Guggenheim, M., Gmur, R., Giertsen, E., and Thurnheer, T. (2004). Application of the Zurich biofilm model to problems of cardiology. *Caries Research*, 38, 212-222.
26. Gurtler, V and Stanisich, V A (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, 3-16.
27. Handelsman, J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 669-685.
28. Hannig, C., Sorg, J., Spitzmüller, B., Hanning, M., and Al-Ahmad, A. (2009). Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *Journal of Dentistry*, 37, 560-566.
29. Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D. and de Vos, W.M. (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 114–123.
30. Herp A., Wu A.M., Moschera J. (1979). Current concepts of the structure and nature of mammalian salivary mucous glycoproteins. *Mol Cell Biochem*, 23,27-44.
31. Hirota, S., Nishiora, T., Shimoda, T., Miura, K., Ansai, T., and Takahama, U. (2001). Quercetin glucosides are hydrolyzed to quercetin in human oral cavity to participate in peroxidasedependent scavenging of hydrogen peroxide. *Food Science and Technology Research*, 7, 239-245.
32. Huys, G., Vancanneyt, M., D’Haene, K., Falsen, E., Wauters, G. and Vandamme, P. (2007). *Alloscardovia omnicoles* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1442–1446.

33. Jenkinson, H. F., and Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, 13, 589-595.
34. Kaufman, E., and Lamster, I. B. (2000). Analysis of saliva for periodontal diagnosisda review. *Journal of Clinical Periodontology*, 27, 453-465.
35. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM (2003). Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 558–563.
36. Klein, D., Janda, P., Steinborn, R., Müller, M., Salmons, B., Günzburg, W.H. (1999). Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis*, 20, 291–299.
37. Kongstad, J., Hvidtfeldt, U. A., Gronbaek, M., Jontell, M., Stoltze, K., and Holmstrup, P. (2008). Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City heart study. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 1032-1039.
38. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. (2005). Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3944–3955.
39. Lamont, R. J., R. A. Burne, M. S. Lantz, and D. J. Leblanc. (2006). *Oral microbiology and immunology*. ASM Press, Washington, DC.
40. Lerman, L S, Fischer, S G, Hurley, I, Silverstein, K and Lumelsky, N (1984) Sequencedetermined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13, 399-423.
41. Lansac, N., Picard, F.J., Ménard, C., Boissinot, M., Ouellette, M., Roy, P.H. and Bergeron, M.G. (2000). Novel genus-specific PCR-based assays for rapid identification of *Neisseria* species and *Neis-seria meningitidis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 443–451.
42. Li, W, Wooley, J C and Godzik, A (2008) Probing metagenomics by rapid cluster analysis of very large datasets. *PLoS One*, 3, 3375.
43. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeyuchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39,81-86.

44. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
45. Marcobal, A., Barboza, M., Froehlich, J.W., Block, D.E., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A. (2010). Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5334–5340.
46. Marsh, P. and Martin, M.V. (1999). *Oral microbiology*. Wright, Oxford, United Kingdom.
47. Marsh, P. D., and Percival, R. S. (2006). The oral microflora- friend or foe? Can we decide? *International Dental Journal*, 56, 233-239.
48. Maukonen, J., Mättö, J., Suihko, M. L., and Saarela, M. (2008). Intraindividual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 1560-1568.
49. Mayanagi, G., Kimura, M., Nakaya, S., Hirata, H., Sakamoto, M., Benno, Y., Shimauchi, H. (2009) Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 506–513.
50. Mayo, B, Marzotto, M, Flórez, A B, Torriani, S (2008) Culture-independent microbial techniques in dairy microbiology: the state of the art. En: *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications* (eds. Baltasar Mayo, Paloma López, Gaspar Pérez-Martínez). Research Signpost, Kerala, India, 1-27.
51. Monagas, M., Hernández-Ledesma, B., Garrido, I., Martín- Alvarez, P. J., Gómez-Cordovés, C., and Bartolomé, B. (2005). Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutrition and Cancer*, 53, 244-254.
52. Muyzer, G and Smalla, K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 127-141.
53. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*, 19, 636–643.
54. Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., et al. (2010). Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. (Version 1.5.2, Available at: www.phenol-explorer.eu). Database, doi: 10.1093/database/bap024.

55. Noor, S.O, Ridgway, K., Scovell, L., Kemsley, E.K., Lund, E.K., Jamieson, C., Johnson, I.T., Narbad, A. (2010). Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC Gastroenterology*, 12, 10,134.

56. Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., and Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *The Journal of Bacteriology*, 178, 5636-5643.

57. Paju, S., and Scannapieco, F. A. (2007). Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Diseases*, 13, 508-512.

58. Parisis, D. M., and Pritchard, E. T. (1983). Activation of rutin by human oral bacterial isolates to the carcinogen-mutagen quercetin. *Archives of Oral Biology*, 28, 583-590.

59. Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J. A., and Dewhirst, F.E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* 2000, 42, 80-87.

60. Pozo-Bayón, M. A., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, in press.,doi:10.1080/10408398.2010.489398.

61. Raes J, Bork P (2008). Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. *Nature Reviews Microbiology*, 6,693–699.

62. Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L. and Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1166–1177.

63. Sanguinetti, C. J., Dias-Neto, E., and Simpson, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17, 914–921.

64. Salonen, A., Nikkilä,J., Jalanka-Tuovinen J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen R.A., Palva, A., de Vos W.M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 127–134.

65. Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M. and de Vos, W.M. (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 504–513.
66. Selma, M. V., Espín, J. C., and Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6485-6501.
67. Shah H. N, Collins M. D. (1990). *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenica* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *International Journal of Systematic and evolutionary Bacteriology*, 40, 205-208.
68. Signoretto, C., G. Burlacchini, F. Bianchi, G. Cavalleri, and P. Canepari. (2006). Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. *New Microbiologica*, 29,293–302.
69. Signoretto, C., and Canepari, P. (2009). Anticaries and antiadhesive properties of food constituents and plant extracts and implications for oral health. In Michael Wilson (Ed.), 'Food constituents and oral health' (pp 240-262). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
70. Signoretto, C., Bianchi, F., Burlacchini, G., Sivieri, F., Spratt, D., Canepari, P. (2010). Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 347-56.
71. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J. A., Uzel, N. G., et al. (2004). Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiology and Immunology*, 19, 352-362.
72. Tabasco,R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Peláez, C., Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 28, 1345-1352
73. Tannock, G W, Tilsala-Timisjarvi, A, Rodtong, S, Ng, J, Munro, K and Alatossava, T (1999) Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4264-4267.
74. Thimothe, J., Bonsi, J. A., Padilla-Zakour, O. I., and Koo, H. (2007). Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis Interspecific Hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10200-10207.

75. Thurnheer, T., Giertsen, E., Gmur, R., and Guggenheim, B. (2008). Cariogenicity of soluble starch in oral in vitro biofilm and experimental rat caries studies: a comparison. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 829-836.
76. Tian, Y., He, X., Torralba, M., Yooseph, S., Nelson, K.E., Lux, R., McLean, J.S., Yu G. and Shi W. (2010) Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Molecular Oral Microbiology*, 25, 357–367.
77. van den Bogert, B. de Vos, W.M., G. Zoetendal, E.G. and Kleerebezem, M. (2011). Microarray Analysis and Barcoded Pyrosequencing Provide Consistent Microbial Profiles Depending on the Source of Human Intestinal Samples *Appl. Environ. Microbiol*, 77, 2071–2080.
78. van der Hoeven J.S., Camp P. J. (1991). Synergistic degradation of mucin by *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguis* in mixed chemostat cultures. *Journal of Dental Research*, 70, 1041–1044.
79. Walle, T., Browning, A. M., Steed, L., Reed, S. G., and Walle, U. K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *Journal of Nutrition*, 135, 48-52.
80. Wickstrom C., Svensater G. (2008). Salivary gel-forming mucin MUC5B - a nutrient for dental plaque bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, 177-182.
81. Wilson, M. (2005). *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease* (Cambridge University Press, Cambridge).
82. Wilson, M. (2008). *Bacteriology of humans: an ecological perspective*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
83. Wu, C. D. (2009). Grape products and oral health. *Journal of Nutrition*, 139, 1818S-1823S.
84. Wu, C. D., and Wei, G. (2009). Tea as a functional food for oral health. In M. Wilson (Ed.), *Food constituents and oral health* (pp. 396-417). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
85. Yang, C. S., Lee, M. J., and Chen, L. (1999). Human salivary tea catechi levels and catechin esterase activities: implications in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, 8, 83-89.

86. Yu, Z., Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, 36, 808–812.
87. Zaura E., Keijser B.J., Huse S.M., Crielaard W. (2009). Defining the healthy ‘core microbiome’ of oral microbial communities. *BMC Microbiology* 9, 259.
88. Zhang, G.Y., Mills, D.A., Block, D.E., 2009. Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of lactococci, enterococci, and streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1080–1087.
89. Zijnge, V., G. W. Welling, J. E. Degener, A. J. van Winkelhoff, F. Abbas, and H. J. M. Harmsen. (2006). Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3628–3633.